抗埃博拉病毒核蛋白抗体的制备与双抗夹心 ELISA 检测方法的建立

刘俊伟[1]，常瑞恒[1]，回鹏[1,2]，董士尚[1,2]，王金凤[1,2]，孙波[1]，杨诚[1,2]

（[1]天津国际生物医药联合研究院，天津市，300457；[2]南开大学药学院，天津市，300071）

【摘要】目的 制备抗埃博拉病毒核蛋白（EBOV NP）单克隆抗体和多克隆抗体，建立针对EBOV NP的ELISA检测方法。方法 以重组EBOV NP免疫动物并制备多克隆抗体和单克隆抗体。在此基础上，通过优化抗体浓度、包被液等条件建立检测EBOV NP的双抗夹心ELISA方法。结果 制备出了兔多克隆抗体，筛选出2株可分泌单克隆抗体的鼠源杂交瘤细胞株。Western Blot实验结果表明兔多抗与鼠单抗的结合区域均为N端1~35氨基酸。通过优化，建立了针对EBOV NP的双抗夹心ELISA检测方法。其线性范围是31.2 -1000 ng/mL，最低检测限为2.6 ng/mL。结论 制备出了抗EBOV核蛋白的高特异性多克隆抗体和单克隆抗体，建立了定量检测EBOV核蛋白的方法。

关键词：埃博拉病毒；核蛋白；抗体；双抗夹心ELISA法

中图分类号：Q819　　　　文章标识码：A

Preparation of Anti-ebola Nucleoprotein Antibodies and Establishment of Sandwich ELISA Assay

LIU Jun-wei[1], CHANG Rui-heng[1],HUI Peng[1,2], DONG Shi-shang[1,2], WANG Jin-feng[1,2], SUN Bo[1],YANG Cheng[1,2](1. *Tianjin International Joint Academy of Biomedicine,Tianjin*300457, *China*；

2. *School of pharmacy Nankai University*, *Tianjin*300071, *China*)

[Abstract] Objective To prepare the anti-Ebola nucleoprotein monoclonal and polyclonal antibodies, and establish a method for determining the EBOV nucleoprotein. **Methods** The rabbits and mice were immunized with EBOV nucleoprotein for preparing polyclonal and monoclonal antibodies, respectively. After optimized the conditions, such as the concentration of antibodies, coating solution and so on, the sandwich ELISA was established. **Results** The polyclonal antibodies and two hybridoma cell lines that could produce monoclonal antibodies were prepared. The results of western blot showed that the binding region of both polyclonal and monoclonal antibodies were in N terminal 1~35 amino acid of the nucleoprotein. The sandwich ELISA for detecting EBOV nucleoprotein has been optimized. The linear range of detection was 31.2 -1000 ng/mL. And the limit of detection was 2.6 ng/mL. **Conclusions** The high specific polyclonal and monoclonal antibodies of anti-EBOV nucleoprotein were prepared. The quantitative method to detecting EBOV nucleoprotein was established.

[Keywords]Ebola virus; Nucleoprotein; Antibody; Sandwich ELISA

埃博拉出血热（Ebola hemorrhagic fever）是由埃博拉病毒（Ebola virus，

基金项目：基于 HIV-1 整合酶的抗艾滋病药物开发，基金号：13ZCZDSY04200

第一作者：刘俊伟，工程师，主要研究方向：抗体研发与诊断试剂开发，E-mail：ljwmars@163.com

EBOV）引发的人畜共患急性出血性传染病[1]。目前已鉴定的EBOV有5种亚型：本迪布焦型埃博拉病毒（Bundibugyo ebolavirus，BDBV），扎伊尔型埃博拉病毒（Zaire ebolavirus，ZEBOV），莱斯顿型埃博拉病毒（Reston ebolavirus，RESTV），苏丹型埃博拉病毒（Sudan ebolavirus，SUDV），塔伊森林型埃博拉病毒(Taï Forest ebolavirus，TAFV）[2,3]。其中，扎伊尔型EBOV和苏丹型EBOV毒力最强[4]。

埃博拉病毒属丝状病毒科，为不分节段的单股负链RNA病毒，其分子量为4.2×10^6Da[5]，于1976年被首次分离[6,7]。整个基因组共编码7种蛋白质，分别为NP—VP35—VP40—GP—VP30—VP24—L，每种蛋白均由一条单独的mRNA所编码[8]，其中核蛋白（nucleoprotein，NP）是核衣壳的主要组成部分。

埃博拉病毒核蛋白包括一个N端寡聚结构域，中间无序区以及C端结构域。其中N端寡聚结构域（EBOV NP，1~450氨基酸），包括参与病毒核蛋白寡聚的两端短臂以及负责与病毒RNA结合的中间核心结构域，在病毒转录复制过程中起着非常重要的作用[9]。此外，NP在埃博拉病毒颗粒中高度表达且较为保守，可用于疾病诊断和监控的目标分子[10-12]。

1 材料与方法

1.1材料

1.1.1 主要实验材料

扎伊尔型埃博拉病毒核蛋白（EBOV NP）寡聚结构域的1~450位氨基酸重组蛋白（EBOV NP 1~450，Genebank No.911830）和36~450位氨基酸重组蛋白（EBOV NP 36~450）已由课题组前期表达制备[13]。经测定EBOV NP 1~450可与埃博拉病毒RNA结合，EBOV NP 36~450可与埃博拉病毒VP35蛋白结合，因此其生物学活性符合相关文献报道[14-16]。

1~35位氨基酸多肽（EBOV NP 1~35）为上海吉尔生化公司合成。弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、50%PEG1450溶液、HAT和HT选择性培养基均为Sigma产品；96孔酶标板购于丹麦Nunc公司；牛血清白蛋白（BSA）为上海生工公司产品；蛋白A-Sepharose 4B和蛋白G-Sepharose 4B亲和层析柱，购自GE公司；单抗亚型鉴定试剂盒，购自BD Biosciences公司；HRP偶联试剂盒购自北京博奥森公司。其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.2 主要仪器

酶标仪，美国Thermo；CO2培养箱，日本三洋；倒置显微镜，日本OLYMPUS；生物安全柜，海尔公司；PCR仪，塞维斯科技（北京）有限公司；高压细胞破碎仪，广州聚能生物科技有限公司；FPLC蛋白自动纯化系统，GE Healthcare公司。

1.1.3 实验动物

Balb/c小白鼠，雌性，6-8周龄；大耳白兔，雄性，3个月龄，均购于天津实验动物中心。

1.2方法

1.2.1动物免疫

（1）将弗氏佐剂与EBOV NP 1~450混合后免疫大耳白兔，取血清并采用间接ELISA测定效价超过1∶1×10^5后，取全血离心后获得抗血清。

（2）将弗氏佐剂与EBOV NP 1~450混合免疫Balb/c小鼠。待血清效价达到1∶1×10^4以上时，用常规剂量的抗原生理盐水稀释，尾静脉免疫小鼠，3天后取脾脏细胞备用。

1.2.2细胞融合及杂交瘤细胞筛选

将脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞（NS-1）融合，再分别使用HAT和HT培养基进行培养初筛，并用有限稀释法筛选出2株可分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞。亚型鉴定结果表明分泌出的单克隆抗体亚型均为IgG1,κ。

1.2.3抗体纯化

对小鼠进行体内接种杂交瘤细胞，1周后收集腹水，用蛋白G-Sepharose 4B亲和层析柱纯化得到单克隆抗体。将兔子抗血清用蛋白A-Sepharose 4B亲和层析柱纯化得到多克隆抗体，并对抗体浓度进行了测定。

1.2.4抗体结合区域鉴定

通过与不同长度片段的EBOV NP（1~450位氨基酸；1~35位氨基酸；36~450位氨基酸）作对照实验，利用western-blot与ELISA方法联合使用对兔多抗、鼠单抗的结合区域进行分析。

间接ELISA方法简述如下：

（1）包被EBOV NP于酶标板上，4℃冰箱过夜；

（2）用 PBST 洗板后，加入 1% BSA 进行封闭；

（3）将抗体梯度稀释后加入到酶标板中；

（4）洗板后加入酶标二抗，室温孵育；

（5）洗板后加入 TMB 底物液，显色 30 分钟；

（6）加入终止液。

1.2.6双抗体夹心ELISA方法的优化与建立

（1）兔多抗与单抗配对优选

根据ELISA方法步骤，将5 μg/mL兔多抗包被到酶标板上，封闭后加入5 μg/mL EBOV NP 1~450，并加入0.25 μg/mL单克隆抗体及羊抗鼠-HRP后显色测定，根据A_{450}值的高低选择可与多抗配对的单克隆抗体。

（2）双抗夹心ELISA法操作流程

兔多抗包被聚苯乙烯酶标板（包被抗体），4℃过夜，封闭液封闭，室温孵育1h后加入抗原EBOV NP，室温温育1h后加入偶联HRP鼠单抗（酶标抗体），室温温育30 min后加入TMB底物溶液显色，室温孵育20 min后用2 mo1/L H_2SO_4终止反应，最后用酶标仪测定450 nm 吸光度值。

（3）包被抗体与酶标抗体最佳反应浓度的确定

本实验利用HRP偶联试剂盒将HRP偶联到鼠单抗上制备出酶标抗体，并利用方阵法对包被抗体和酶标抗体的反应浓度进行优化。包被抗体用PBS分别稀释为20μg/mL、10μg/mL、5μg/mL和2.5μg/mL；封闭后每个包被浓度分别加入阳性溶液和阴性溶液，其中阳性溶液为0.25 μg/mL EBOV NP；阴性溶液为PBS缓冲液溶液。酶标抗体用PBS梯度稀释1000、2000、4000和8000倍。显色后读数，根据阳性孔A_{450}值(Positive，P)在l.0左右（A_{450} 吸光值为1.0左右时灵敏度最高），且阳性值与阴性值的比值较大所对应的抗体浓度为最佳反应浓度。

（4）包被液的选择

分别以0.01 mo1/LPBS、0.05 mol/L Na_2CO_3-$NaHCO_3$(NBS)和生理盐水作包被液，按双抗夹心ELISA步骤进行反应，比较不同包被液对结果的影响。

（5）封闭液的选择

分别以1%的BSA-PBS，3%的BSA-PBS，3%的脱脂奶粉-PBS及酶标板稳定剂（湖州英创生物科技有限公司）为封闭液进行条件优化。

（6）TMB底物作用时间的选择

加入底物后，室温下分别作用10、20、30 min，最后根据A_{450}值选择出最佳

底物作用时间。

2 结果与分析

2.1抗体纯化

通过免疫，本实验获得了针对EBOV NP的抗血清，经亲和层析纯化得到兔源多克隆抗体，浓度为10 mg/mL（如图1）。

利用细胞融合技术，本实验制备出2株可分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株，分别命名为1C3和4G3。经纯化小鼠腹水得到单克隆抗体1C3的浓度为3.4 mg/mL，4G3的浓度为2.1 mg/mL。

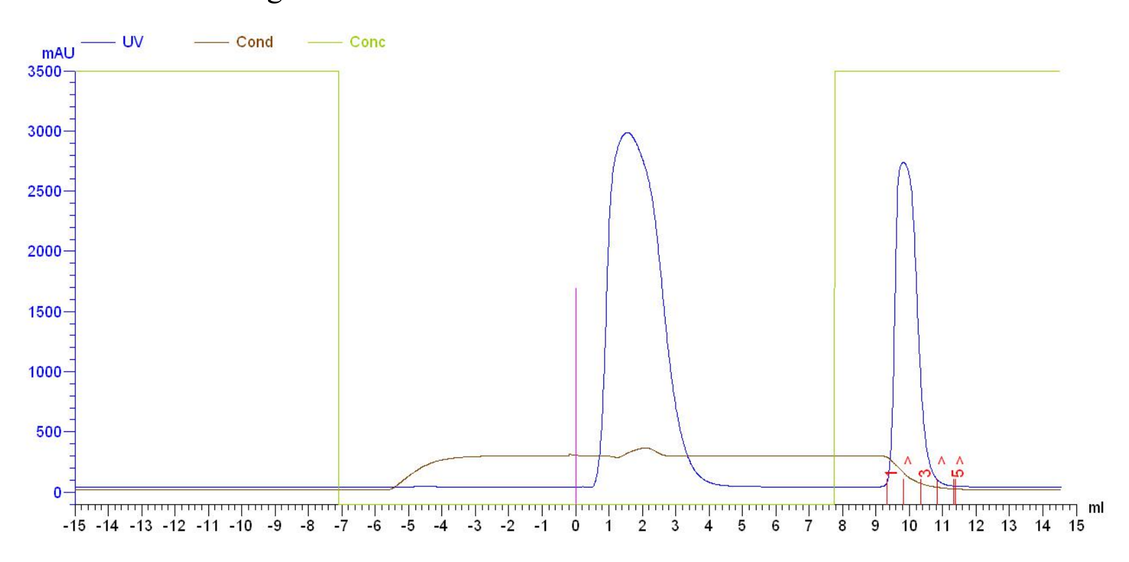


图1 多克隆抗体纯化图

Fig. 1 Purification of polyclonal antibody

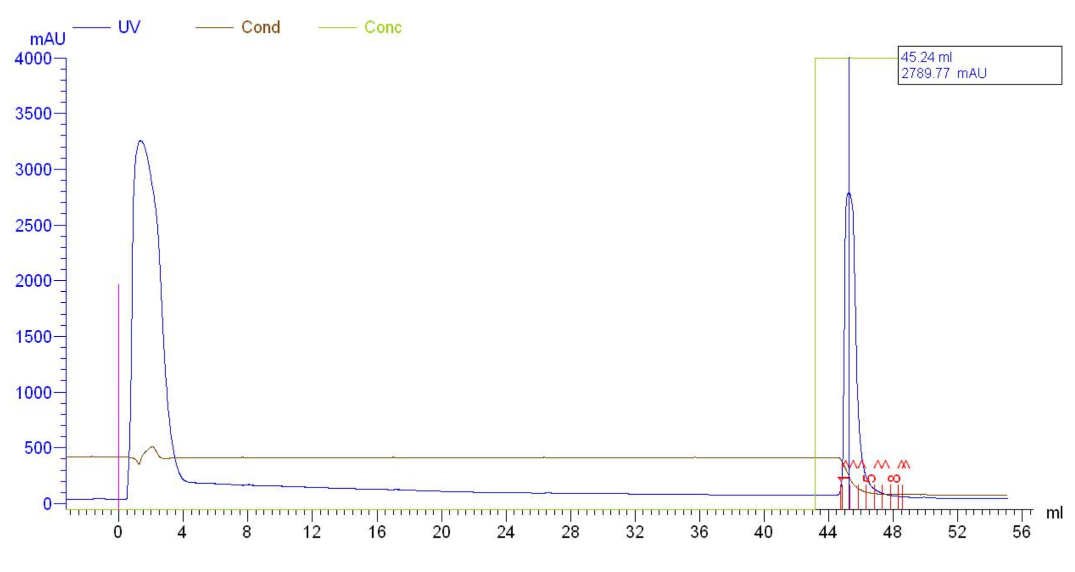


图2 单克隆抗体1C3的纯化图

Fig. 2 Purification of monoclonal antibody 1C3

为验证抗体纯化效果，本研究对单克隆抗体1C3进行了SDS-PAGE电泳实验，结果表明（如图3）样品在25~35 kDa和45~66kDa中间都出现了蛋白条带，其分子量大小与鼠源单克隆抗体轻链和重链的理论值（轻链26 kDa、重链56 kDa）基本一致，电泳条带没有拖尾现象及其他杂带，表明抗体纯度较好。

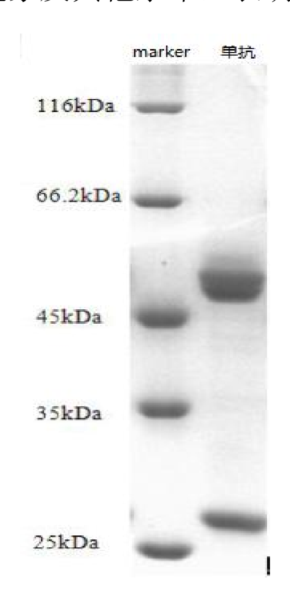


图3单抗1C3的SDS-PAGE图

Fig.3 The SDS-PAGE result of monoclonal 1C3

另外，本实验根据公式 Kaff=(n-1)/{2(n[Ab']$_t$-[Ab]$_t$)}，计算出抗体的亲和力常数 Kaff 值[17]，其中兔多抗的 Kaff 值为 2.8×10^8 L/mol；4G3 为 4.3×10^8 L/mol，1C3 为 5.4×10^8 L/mol。

2.2 抗原结合区域鉴定

Western-blot实验结果表明(如图4)，在EBOV NP 1~450（泳道1）有发光条带，而36~450（泳道2）没有发光条带，由此推测与抗体结合的抗原区域为EBOV NP 1~35。为进一步验证与抗体结合的与抗原区域，本研究采用间接ELISA方法将多抗和单抗1C3分别与EBOV NP 1~35和36~450抗原进行结合实验。如图5结果显示，以EBOV NP 1~35作为包被原进行ELISA实验，吸光值随着抗体浓度的增大而增大，说明1~35与抗体有特异性结合；而以36~450作包被原，ELISA的吸光值很低且基本不变。

单抗4G3经Western-blot和ELISA实验测定，其结果与1C3相似。说明本实验

得到的两种单抗均与EBOV NP 1~35结合。

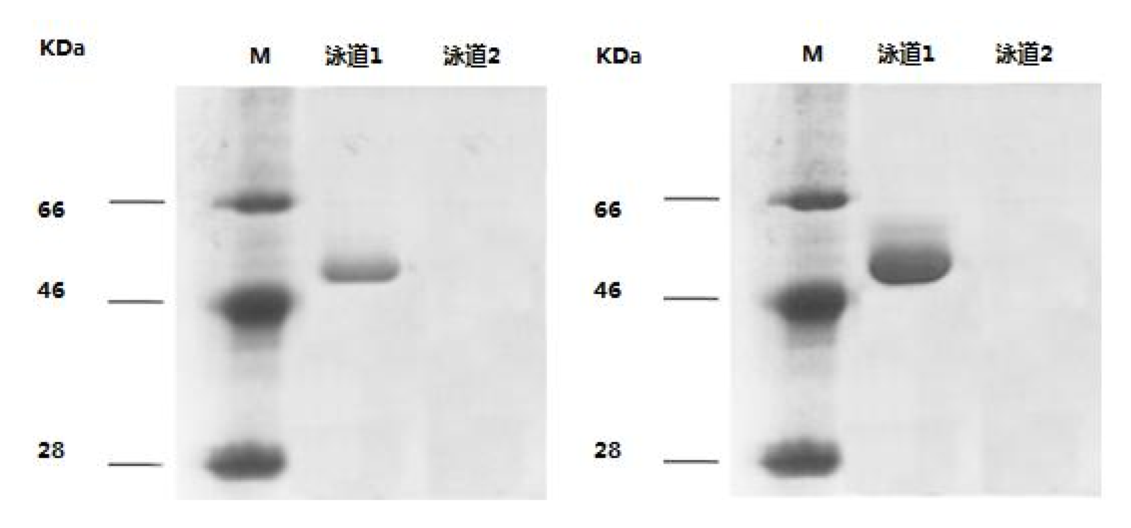


图4. EBOV NPwestern-blot结果（左：鼠单抗1C3，右：兔多抗）

Fig.4 Western-blot of EBOV NP

(left: made by monoclonal antibody 1C3, right: made by polyclonal antibodies)

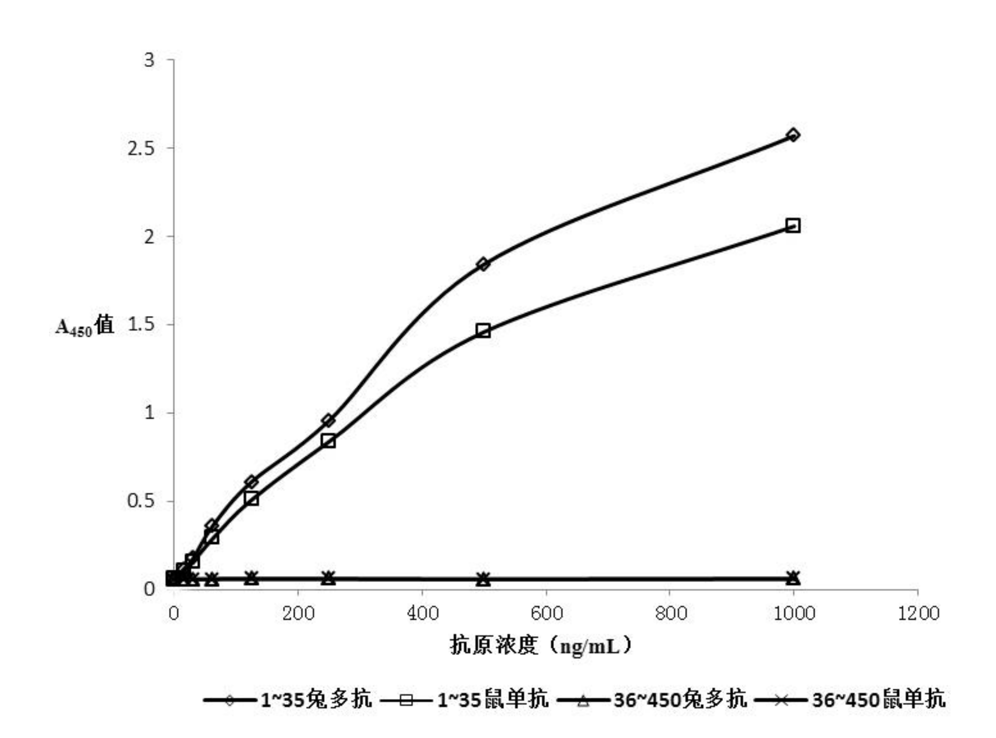


图5.ELISA方法测定抗原结合区域

Fig.5Determination of antigen binding region by ELISA

2.3双抗体夹心ELISA法的建立

2.3.1兔多抗与单抗配对的优选

抗体配对实验结果表明，本实验获得的两株单抗均可以与兔多抗配对进行双抗夹心ELISA检测，其中单抗1C3的A_{450}平均值为1.395（n=5），单抗4G3的A_{450}平均值为1.105（n=5）。本实验选择了吸光值较高的单抗1C3与HRP偶联，制备酶标抗体。

2.3.2包被抗体与酶标抗体最佳反应浓度的确定

本研究采用方阵法同时对ELISA反应中的包被抗体与酶标抗体浓度进行优化（见表1）。选择P值在1.0左右且P/N值较大的包被抗体与酶标抗体的浓度。最终确定最佳包被抗体浓度为5 μg/mL，最佳酶标抗体稀释倍数为8000倍。

表1. 包被抗体与酶标抗体最佳反应浓度的确定

Table 1.Optimization of the coated antibody and HRP labeled antibody

酶标抗体	包被抗体			
	20μg/mL	10μg/mL	5μg/mL	2.5μg/mL
1:8000（P）	1.016	0.963	0.912	0.886
(N)	0.091	0.100	0.082	0.082
P/N	11.16	9.63	11.12	10.80
1:4000（P）	1.879	1.796	1.7	1.622
(N)	0.146	0.149	0.116	0.118
P/N	12.86	12.05	14.66	13.74
1:2000（P）	3.155	3.08	2.9	2.82
(N)	0.254	0.240	0.205	0.186
P/N	12.42	12.83	14.15	15.16
1:1000（P）	3.989	3.872	3.794	3.565
(N)	0.404	0.356	0.291	0.247
P/N	9.87	10.88	13.04	14.43

2.3.3包被液的选择

利用3种包被液对实验进行测定，如图6显示其效果差别不大，说明包被液对该检测方法的影响较小。因此选择了常用的磷酸盐缓冲液PBS作为包被液。

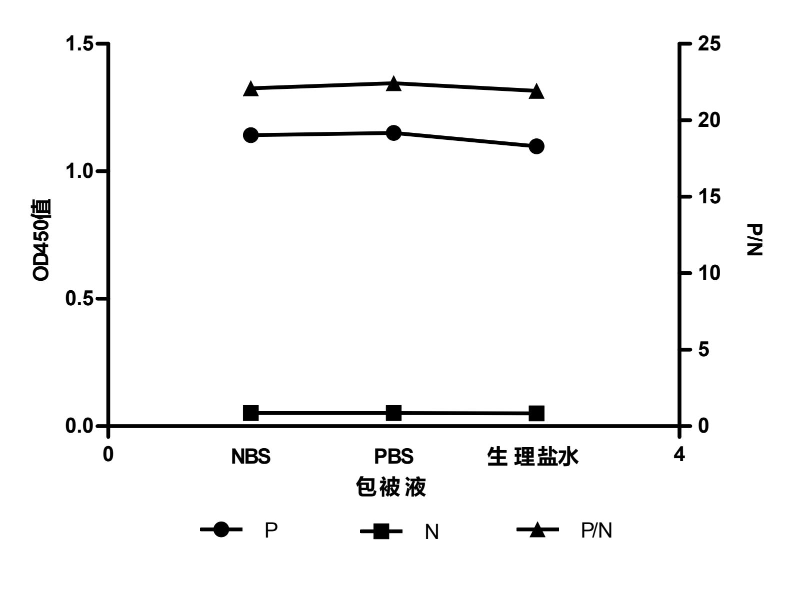


图6. 包被液的优化

Fig.6 Optimization of coating buffer

2.3.4 封闭液的选择

以封闭液为单一变量进行优化，选择了产品化的酶标版稳定剂、3%脱脂奶粉、1%BSA和3%BSA分别对酶标板进行封闭。结果显示四种封闭液的封闭效果相近，由于1%BSA的P/N值略高于其他溶液，因此确定其作为最佳封闭液（见图7）。

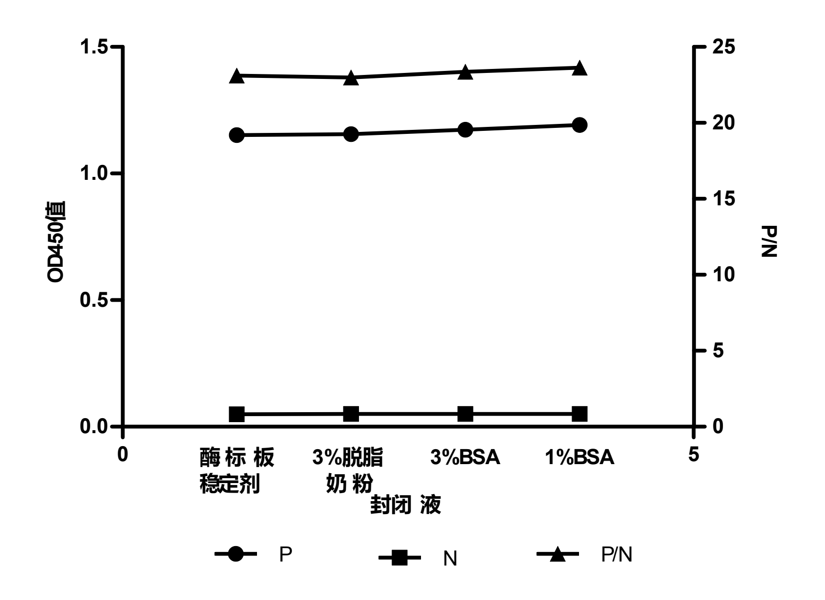


图7. 封闭液的优化

Fig.7 Optimization of blocking buffer

2.3.5 TMB底物作用时间的选择

显色时间长短可能会对检测方法的灵敏度产生影响，因此本研究对底物作用时间进行了优化。根据P/N值的高低，选择了底物作用20min为最优条件（如图8）。

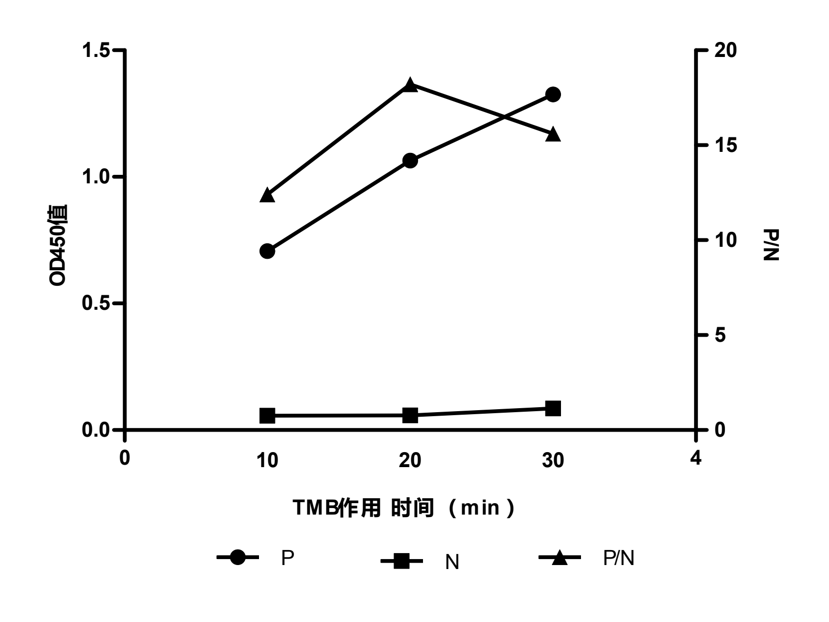


图8. 显色时间的优化

Fig.8 Optimization of color developing time

2.3.6双抗夹心ELISA法标准曲线的建立

根据以上优化结果，本研究建立了双抗夹心ELISA检测方法并绘制了标准曲线（如图9）。该检测方法在31.2 ~1000 ng/mL 之间线性范围较好（R^2=0.9934）。

本研究测定出了该方法的最低检测限，即用PBS溶液作为空白样本进行检测，重复测定20次，计算A_{450}的均数M和标准差SD，并将M＋2SD值带入标准曲线，计算出对应的浓度值。经计算，最低检测限为2.6 ng/mL。

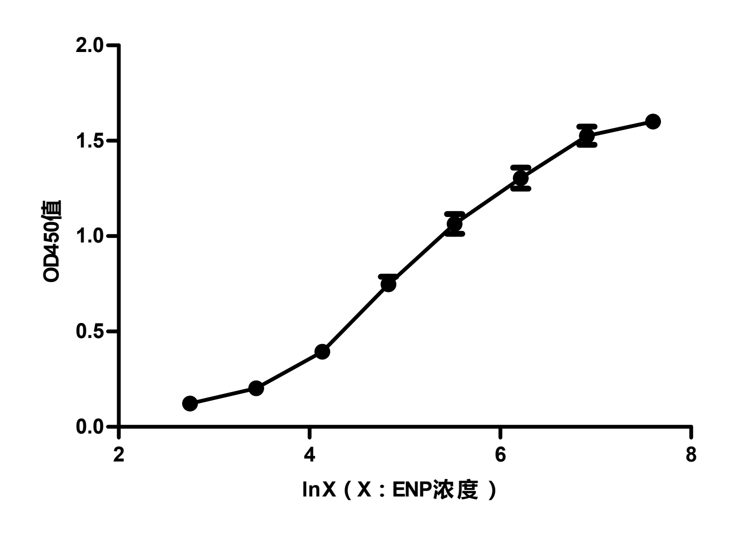


图 9. 双抗夹心 ELISA 法标准曲线（n=5）

Fig.9 Standard curve of sandwich ELISA assay（n=5）

3 讨论

2014年在西非多个国家爆发的埃博拉病毒疫情曾经触动了全世界的神经。虽然近两年人感染埃博拉病例鲜有报道，但对该病毒的防控工作仍不能松懈。在实验室检测方面，该病毒的核酸检测和免疫学检测方法可以在生物安全P3级实验室中进行，并且目前应用较为广泛[18]。PCR检测容易造成假阳性，恢复期患者在检测时也会有假阴性结果[19]。但由于该病疫情易爆发于非洲等欠发达地区，因此非常有必要开发出操作简便、设备简单、能在现场快速检测EBOV的方法和试剂盒。

氨基酸序列高度保守的核蛋白是比较理想的检测目标物，而本实验选择的EBOV NP在不同亚型的埃博拉病毒之间较为保守。因此本研究以EBOV NP为检测目标物，瞄准对埃博拉病毒进行快速、定量检测这一目标，建立了针对EBOV NP的双抗夹心ELISA检测方法。本研究课题可作为我国防控埃博拉病毒的战略性技术储备，为后续开发出快速检测试剂盒及试纸条奠定了基础，并为埃博拉病毒病患者的治疗效果及预后监测提供工具。

4 结论

本实验制备出了抗埃博拉核蛋白的单克隆和多克隆抗体，并对其结合区域进行了鉴定。在此基础上，通过对包被抗体与酶标抗体的浓度、包被液、封闭液以及TMB底物作用时间等条件的优化，建立了双抗夹心ELISA方法。该方法的最低检测限为2.6 ng/mL，可用于EBOV NP的定量检测。

参考文献

[1] 林祥梅，韩雪清，王景林.外来动物免疫.北京：科学出版社，2014.
Lin X M, Han X Q, Wang J L. Exotic animal disease. Beijing: Science Press, 2014: 296-324.

[2] Pourrut X, Kumulungui B, Wittmann T, et al. The natural history of Ebola virus in Africa. Microbes and infection/Institut Pasteur, 2005, 7 (7-8): 1005-1014.

[3] Li Y H, Chen S P. Evolutionary history of Ebola virus . Epidemiology and Infection, 2014, 142(6): 1138-1145.

[4] Morikawa S, Saijo M, Kurane I. Current knowledge on lower virulence of Reston Ebola virus (in French: Connaissances actuelles sur la moindre virulence du virus Ebola Reston). Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2007, 30(5-6): 391-398.

[5] 程颖，刘军，李昱，等. 埃博拉病毒病：病原学、致病机制、治疗与疫苗研究进展. 科学通报，2014，59(30)：2889-2899.
Cheng Y, Liu J, Li Y, et al. Ebola virus disease: virology, pathogenesis, therapy, and vaccines. Chinese science Bulletin, 2014, 59(30): 2889-2899.

[6] Knipe D M, Howley P M, Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

[7] Fauquet C, Mayo M A, Maniloff J.Virus Taxonomy. London: Elsevier/Academic Press, 2004.

[8] Felomann H, klenkH D, Marburg and Ebola virus.Advance in Virus Research, 1996, 47:1-52.

[9] Shi W, Huang Y, Sutton-Smith M, et al. A filovirus-unique region of Ebola virus nucleoprotein confers aberrant migration and mediates its incorporation into virions. Journal of Virology, 2008, 82(13): 6190-6199.

[10] Watanabe S, Watanabe T, Noda T, et al. Production of novel Ebola virus-like particles from cDNAs: an alternative to Ebola virus generation by reverse genetics. Journal of Virology, 2004, 78(2): 999-1005.

[11] Watanabe S, Noda T, Kawaoka Y. Functional mapping of the nucleoprotein of Ebola virus. Journal of Virology, 2006, 80(8): 3743-3751.

[12] Sullivan N, Yang Z Y, Nabel G J. Ebola virus pathogenesis: implications for vaccines and therapies. Journal of Virology, 2003, 77(18): 9733-9737.

[13] Dong S, Yang P, Li G, et al. Insight into the Ebola virus nucleocapsid assembly mechanism: crystal structure of Ebola virus nucleoprotein core domain at 1.8 Å resolution. Protein & Cell, 2015, 6(5):351-62.

[14] Kirchdoerfer R, Abelson D, Li S, et al. Assembly of the Ebola Virus Nucleoprotein from a Chaperoned VP35 Complex. Cell Reports, 2015, 12(1):140–149.

[15] Dziubańska P J, Derewenda U, Ellena J F, et al. The structure of the C-terminal domain of the Zaire ebolavirus nucleoprotein. Acta Crystallographica, 2011, 70(Pt 9):2420.

[16] Leung, Daisy, Borek, et al. An Intrinsically Disordered Peptide from Ebola Virus VP35 Controls Viral RNA Synthesis by Modulating Nucleoprotein-RNA Interactions. Cell Reports, 2015, 11(3):376–389.

[17] Beatty J D, Beatty B G, Vlahos W G. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay. J Immunol Methods, 1987, l00:173.

[18] 乔晋娟，罗俊，危宏平．埃博拉病毒感染的实验室诊断方法研究进展．科技导报，2015，33(1)：100-106．

Qiao J J, Luo J, Wei H P. Research Progress on laboratory diagnosis of Ebola virus infection. Science and Technology Review, 2015, 33(1): 100-106.

[19] Towner J S, Rollin P E, Bausch D G, et al. Rapid diagnosis of Ebola hemorrhagic fever by reverse transcription-PCR in an outbreak setting and assessment of patient viral load as a predictor of outcome. Journal of Virology, 2004, 78(8):4330-4341.